



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dip. di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

## Confronto di tre diversi protocolli superovulatori nella bovina

Relatore

Prof. Antonio Mollo

Correlatori

Dott. Calogero Stelletta

Dott. Pierluigi Guarneri

Laureanda

Elisa Marchesan

Matricola n. 576138/MV

ANNO ACCADEMICO

2012 - 2013



## **Indice**

<b>Riassunto</b>	<b>pag.3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>pag.5</b>
<b>2. SCOPO</b>	<b>pag.13</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>pag.15</b>
3.1. Animali e luoghi	pag.15
3.2. Protocolli di trattamento	pag.15
3.3. Raccolta degli embrioni	pag.16
3.4. Valutazione degli embrioni	pag.16
3.5. Dati raccolti	pag.17
3.6. Analisi statistica	pag.17
<b>4. RISULTATI</b>	<b>pag.19</b>
4.1. Confronto tra i tre protocolli superovulatori	pag.19
4.2. Confronto tra i protocolli meccanico e classico rispetto alla stagione di raccolta	pag.20
4.3. Confronto dei tre protocolli rispetto all'ordine di parto	pag.23
<b>5. DISCUSSIONE</b>	<b>pag.27</b>
5.1. Confronto tra i tre protocolli superovulatori	pag.27
5.2. Confronto tra i protocolli meccanico e classico rispetto alla stagione di raccolta	pag.27
5.3. Confronto dei tre protocolli rispetto all'ordine di parto	pag.28
<b>6. CONCLUSIONI</b>	<b>pag.31</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag.33</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>pag.39</b>



## Riassunto

Il momento migliore per iniziare i trattamenti superovulatori nella pratica dell'embryo transfer è stato identificato con l'emergenza della seconda ondata follicolare, che si ha tra il giorno 8 e il giorno 12 del ciclo estrale: in questa finestra è possibile somministrare il protocollo a base di pFSH ottenendo risultati ottimali, in quanto viene a mancare l'azione negativa del follicolo dominante. Per evitare di attendere sino a metà del ciclo, e per non dipendere da un attento controllo dell'estro, sono stati messi a punto dei metodi per indurre l'emergenza dell'ovulazione in un momento desiderato: essi consistono nell'aspirazione transvaginale ecoguidata del follicolo dominante oppure la sua soppressione farmacologica mediante applicazione di impianto endovaginale a rilascio lento di progesterone e somministrazione di GnRH. Nel presente lavoro abbiamo messo a confronto questi due protocolli di soppressione del follicolo dominante con il metodo classico di superovulazione a base di pFSH a metà del ciclo estrale, utilizzando 185 bovine di razza frisona (47 manze e 138 vacche) e osservando i risultati in termini di embrioni ottenuti: a 42 bovine è stato applicato il metodo di aspirazione, a 32 quello a base di progesterone e GnRH, a 111 quello classico, successivamente i risultati sono stati valutati anche sulla base della stagione di raccolta e dell'età della donatrice. Non sono state notate differenze in termini di embrioni trasferibili (ossia trasferiti o congelati) tra i protocolli, né tra le stagioni, ma si è avuto un incremento di oociti non fertilizzati con il metodo di aspirazione nelle primipare e nelle bovine più vecchie (quarto parto), e in generale un peggioramento delle performance con l'avanzare dell'età della donatrice. In conclusione, i due protocolli di controllo dell'ovulazione non forniscono un numero maggiore di embrioni trasferibili rispetto al metodo classico ma offrono la possibilità di iniziare il protocollo superovulatorio in un qualsiasi momento del ciclo estrale. Il metodo basato sull'aspirazione del follicolo dominante è quello che produce un maggior numero di oociti, ma molti di questi non vengono fecondati: a nostro parere ciò dipende dalla qualità degli oociti e quindi dalla donatrice, in quanto questo fenomeno si manifesta in specifiche categorie di animali (nelle primipare, animali ancora in fase di sviluppo stressati dalla prima gravidanza, e nelle bovine più vecchie). Il trattamento di superovulazione infatti permette a un maggior numero di oociti di raggiungere l'ovulazione, compresi quelli scadenti che in condizioni normali andrebbero incontro ad atresia.



## 1. Introduzione

E' ormai da oltre quarant'anni che la pratica dell'embryo transfer si sta diffondendo nel mondo della buiatria internazionale, e continui passi avanti vengono effettuati nel campo della ricerca allo scopo di rendere questa pratica più efficiente e produttiva. Si tratta di metodiche sottoposte a una continua opera di miglioramento da parte di numerosi studiosi sin dal lontano 1943, quando Casida e collaboratori tentarono per la prima volta di indurre la superovulazione in delle bovine usando gonadotropine pituitarie, anche se si dovette attendere il 1951 affinché Willet insieme ai suoi collaboratori completasse il primo embryo transfer bovino vitale. Fu però solo dalla fine degli Anni 60 che la tecnica dell'embryo transfer conobbe un forte sviluppo e un rapido, e da allora inarrestabile, progresso.

Uno degli aspetti più analizzati degli ultimi anni è stato senza dubbio lo studio della dinamica follicolare, che ha permesso di rendere più efficace il trattamento superovulatorio delle bovine donatrici.

Molti autori (Bó et al. 1995, Gordon 1996, Baracaldo et al. 2000, Shaw e Good 2000, Mapletoft 2006, Lima et al. 2007, Son et al. 2007) concordano nell'affermare che la risposta superovulatoria è maggiore quando il trattamento superovulatorio viene iniziato al momento dell'emergenza della seconda ondata follicolare, ossia quando il follicolo dominante della prima ondata è ormai atresico, e quello della seconda ondata non è ancora emerso: una asincronia minima, anche solo di un giorno, riduce significativamente la risposta superovulatoria. A detta di questi autori, l'emergenza della seconda ondata follicolare si ha 8-12 giorni dopo l'estro sia nelle bovine a due ondate per ciclo che in quelle a tre ondate (con insorgenza attorno al giorno 10 nelle prime e al giorno 9 nelle seconde), con la presenza di una coorte di follicoli in crescita. E' questa la migliore finestra temporale per la somministrazione di gonadotropine esogene, e nel tempo sono state proposte diverse preparazioni: dagli anni '70 si è utilizzata l'eCG, in quanto capace di mimare sia l'azione del LH che dell'FSH, ma col vantaggio di possedere un'emivita più lunga rispetto alle gonadotropine pituitarie (circa 50 ore contro 30-60 minuti, Peters e Ball 1995), permettendo così di ottenere ovulazioni multiple dopo una sola iniezione. Tuttavia, proprio la lunga emivita di questo ormone costituisce anche il suo principale svantaggio, in quanto la prolungata azione sull'ovaio può indurre ovulazioni asincrone e la persistenza di grossi follicoli non ovulati. Nonostante la messa a punto un farmaco (Neutra PMSG®) che forniva anticorpi monoclonali anti-eCG, l'utilizzo dell'eCG venne gradualmente sostituito da quello delle gonadotropine pituitarie, come si evince dallo studio di Bellow e Short, che nel

1972 pubblicarono un lavoro in cui comparavano gli effetti dell'eCG e dell'FSH: i risultati dimostrarono come le gonadotropine pituitarie dessero risultati di gran lunga superiori in termini di embrioni ottenuti.

Le gonadotropine pituitarie ora più utilizzate sono preparazioni commerciali a base di FSH di origine suina (a cui ci si riferisce come FSH-P o pFSH), che, avendo un'emivita di sole 3-4 ore, vengono somministrate di solito in otto, nove o dieci iniezioni (di quantità uguale o decrescente) nell'arco di quattro-cinque giorni consecutivi. Segue poi la somministrazione di prostaglandine F2 $\alpha$  (solitamente nei giorni 3 e 4 dall'inizio del protocollo di superovulazione) allo scopo di far regredire il corpo luteo e ridurre così la variabilità dell'intervallo tra l'iniezione di gonadotropine e l'estro. Infatti, il normale ciclo estrale può durare tra 18 e 26 giorni, ed è proprio la fase luteinica che contribuisce maggiormente a questa variabilità.

Basandosi quindi sulla durata della fase di sviluppo del follicolo dominante negli intervalli tra le ondate, soltanto il 20% (4 o 5 giorni) del ciclo estrale è disponibile per iniziare il trattamento al momento dell'emergenza dell'ondata follicolare. Perciò, il restante 80% del ciclo non conduce a una risposta superovulatoria ottimale (Bergfelt et al. 1997, Mapletoft 2006), a causa della presenza del follicolo dominante: Guilbault (1991) e Huhtinen (1992) hanno sottolineato infatti che questa condizione riduce la risposta superovulatoria del 40-50%. La necessità di attendere fino a metà del ciclo per iniziare il trattamento superovulatorio, oltre a costringere l'operatore ad attendere 8-12 giorni, implica anche un attento monitoraggio dell'estro, rimanendo comunque alta la variabilità individuale nella risposta ovulatoria. Infatti, come ricorda Sali (1996), "Le varie tecniche non sono affatto ripetibili automaticamente: esiste una estrema variabilità di risposte ai trattamenti superovulatori in termini di ovuli prodotti [...] E' dimostrato inoltre che alcune femmine non rispondono a nessuna delle tecniche superovulatorie proposte [...] L'attitudine a superovulare infine sarebbe determinata geneticamente".

Sebbene non si sia ancora riusciti a limitare questa variabilità individuale, i recenti studi in merito alla dinamica follicolare hanno permesso di elaborare dei metodi per indurre l'emergenza dell'ondata follicolare in un momento desiderato: rimuovendo l'effetto soppressivo del follicolo dominante (fisicamente o farmacologicamente), si permette un rilascio prematuro di FSH e l'emergenza di una nuova ondata in un momento preciso del ciclo (numero fisso di giorni post trattamento) senza dover esser vincolati a un attento monitoraggio dell'estro o alla stretta finestra temporale fissata a metà del ciclo (Bó et al. 1995, Shaw e Good 2000).



Di base, ci sono tre metodi di sincronizzazione dell'emergenza dell'ondata follicolare per la superstimolazione (Mapletoft, 2006), ma dal momento che uno di essi (nonché il più gradito dagli autori che lo hanno testato – Baracaldo 2000, Bó 2002, Mapletoft 2006) comprende l'uso degli estrogeni, vietati nell'UE, verranno di seguito analizzati soltanto gli altri due metodi, ossia la soppressione farmacologica e l'aspirazione per via transvaginale del follicolo dominante. Negli ultimi 25 anni questi metodi sono stati indagati da parte di molti autori stranieri, soprattutto in Canada, ma in parte anche negli USA e in America Latina, per valutarne l'efficacia, in termini di embrioni trasferibili, in rapporto al metodo classico.

Per quanto riguarda il metodo meccanico di soppressione del follicolo dominante, esso consiste nell'aspirazione transvaginale ecoguidata non solo dell'effettivo follicolo dominante, in quanto ciò richiederebbe molti esami ecografici per identificarlo (Bergfelt et al 1997), bensì di tutti i follicoli superiori a 5 mm (Bó et al. 1995, Mapletoft 2006) o dei due follicoli di maggiori dimensioni (Baracaldo et al. 2000); questo provoca un aumento dell'FSH e l'emergenza di una nuova ondata follicolare dopo un giorno (Wiltbank 2011) o due (Baracaldo et al. 2000). In questo momento viene quindi iniziato il trattamento superovulatorio. Molti studi hanno dimostrato che questo protocollo permette di ottenere un numero di oociti/embrioni significativamente maggiore rispetto al protocollo classico (De Ruigh et al. 1996, Kim et al. 2001), ma tra di essi è elevato il numero di oociti non fertilizzati o embrioni degenerati: alla fine, quindi, il numero di embrioni trasferibili rimane comparabile a quello del metodo classico, sebbene con la comodità di iniziare il trattamento in qualsiasi momento del ciclo estrale, e con la sicurezza di farlo coincidere con l'insorgenza dell'ondata follicolare per ottenere una risposta superovulatoria ottimale (Bó et al. 1995, Bergfelt 1997, Beal 1999, Baracaldo et al. 2000, Bó et al. 2002, Lima et al. 2007). Secondo Show e Good (2000) questo dimostrerebbe che l'aspirazione del follicolo dominante aumenta il tasso di ovulazione, ma la qualità degli embrioni ottenuti sarebbe influenzata da fattori non dipendenti dalla dominanza follicolare. Anche secondo Kim e collaboratori (2001), che non trovarono differenze nel numero di embrioni trasferibili, l'aumento del numero di oociti dipenderebbe dal fatto che l'ablazione del follicolo dominante rafforza la crescita follicolare: in pratica negli animali sottoposti ad ablazione la crescita follicolare avverrebbe più precocemente, e al momento del trattamento superovulatorio, quindi, ci sarebbero più follicoli pronti ad essere stimolati.

Uno studio simile, condotto da Hill e Kuehner (1996), ottenne invece un numero di embrioni trasferibili superiore (8,9 vs 6) in bovine sottoposte ad aspirazione ecoguidata di tutti i follicoli rispetto a un gruppo di controllo sottoposto a metodo superovulatorio classico, e risultati positivi in tal senso sono stati ottenuti anche da Lima et al (2007) e da Merton et al. (2003). De Ruigh (1996) ottenne un numero di embrioni totali (vitali e non vitali) superiore rispetto a un gruppo di controllo trattato con metodo classico, anche se la percentuale di embrioni vitali rimaneva simile tra i due gruppi. In un recentissimo lavoro presentato al congresso della Società Italiana di Embryo Transfer del 2012, l'esperto canadese Sauvè ha esposto i risultati ottenuti in seguito a diversi trattamenti di controllo dell'ondata follicolare: quello che in assoluto ha dato i risultati migliori (14 follicoli ottenuti in media contro gli 11-12 degli altri protocolli e 8,3 embrioni trasferiti contro 6,3-7,2) è stato quello basato sull'aspirazione ecoguidata del follicolo dominante 24-48 ore prima dell'inizio del protocollo superovulatorio.

Uno svantaggio di questo metodo rimane comunque la sua difficile applicazione "in campo" (Bó 2008).

Il metodo farmacologico di soppressione del follicolo dominante, come accennato, ha visto spesso, soprattutto negli anni '90, l'utilizzo delle formulazioni di estrogeni (estradiolo valerato o estradiolo-17 $\beta$ ) ma essendo queste vietate nell'UE e in molti altri paesi, tratteremo qui solo dei risultati ottenuti con formulazioni alternative, basate perlopiù sull'utilizzo del GnRH, che si è visto dare risultati superovulatori simili se non migliori dell'estradiolo benzoato, (Mitchell et al. 1998, Kim et al. 2005, Son et al. 2007) in associazione con un dispositivo a rilascio lento di progesterone (endovaginale: PRID® o CIDR®). Il GnRH agisce con un meccanismo recettoriale su follicoli di dimensioni maggiori a 0,8 cm, provocando l'ovulazione o la luteinizzazione del follicolo dominante presente al momento del trattamento e l'emergenza di una nuova ondata follicolare entro due giorni, mentre il progesterone di per sé, a livelli simili a quelli della fase luteinica, provoca la regressione del follicolo dominante e la sua presenza è fondamentale per l'inizio di una nuova ondata follicolare (Bó 2002, Guarneri in Sali 2013). Il GnRH inoltre previene il verificarsi di un estro spontaneo durante il trattamento superovulatorio a base di FSH fino alla luteolisi indotta dalla PGF2 $\alpha$ , e consente di ottenere risposte superovulatorie simili a quelle del protocollo classico ma con la convenienza di iniziare il trattamento in un qualsiasi momento del ciclo (Kohram et al. 2011). Tuttavia, l'utilizzo del solo GnRH viene sconsigliato per l'asincronia dell'emergenza dell'ondata follicolare (momenti diversi del

ciclo estrale danno diverse risposte ovulatorie, Small et al. 2009, Wiltbank 2011) e per il minor numero di embrioni ottenuti rispetto al trattamento con aspirazione del follicolo dominante; anche il progesterone, se utilizzato da solo, può dare risultati contrastanti (Bó 2002). L'associazione dei due farmaci, invece, ha dato risultati confrontabili con quelli dell'ablazione ecoguidata (Bó 2008), oppure inferiori a quest'ultima ma comunque migliori rispetto ai risultati del metodo classico (Sato et al. 2005, Small 2009, Roger 2012). La supplementazione di progesterone nel periodo tra la somministrazione del GnRH e quella della PGF2 $\alpha$  può infatti aumentare le performance riproduttive delle donatrici, in quanto previene le ovulazioni premature (Xu e Burton 1999, Moore e Thatcher 2006). La somministrazione di GnRH prima del trattamento superovulatorio in bovine con impianto CIDR permette di ottenere un controllo della fase luteinica, della crescita follicolare e della sincronizzazione dell'ovulazione (Son et al. 2007), nonché un'emergenza sincrona dell'ondata follicolare e follicoli preovulatori di dimensioni maggiori (Kim et al. 2005). Anche Small e collaboratori (2009) appurarono che le concentrazioni plasmatiche di LH, il diametro del follicolo ovulatorio e il tasso di ovulazione in risposta al GnRH è maggiore quando le concentrazioni plasmatiche di progesterone sono basse, in quanto esse rafforzano la stimolazione della crescita follicolare da parte dell'LH.

Il confronto tra la soppressione meccanica del follicolo dominante e i metodi di superovulazione farmacologici, infine, per quanto questi ultimi siano leggermente diversi tra i vari autori, riporta quasi sempre una parità di risultati tra i due metodi (Bó 1995, Mapletoft 2002), sebbene quello meccanico permetta di iniziare il trattamento superovulatorio prima e consenta una soppressione del follicolo dominante più efficace (in quanto viene fisicamente rimosso, mentre nel trattamento farmacologico questo non avviene) (Baracaldo et al. 2000). Alcuni autori (Hill e Kuehner 1996, Lima et al. 2007, Roger 2012), hanno invece ottenuto risultati migliori in seguito all'ablazione ecoguidata del follicolo dominante.

Ma non è solo il tipo di trattamento superovulatorio utilizzato a influenzare il risultato in termini di embrioni trasferibili ottenuti. Molti autori hanno ipotizzato che sia l'età della donatrice che la stagione dell'anno possano influenzare il risultato in maniera positiva o negativa. Agarwal (1993), Zeron et al. (2001) e Mollo et al. (2007), ad esempio, riscontrarono un tasso ovulatorio e una produzione di embrioni maggiore in inverno: secondo Roth (2008), infatti, le bovine da latte presentano un calo delle performance

riproduttive durante l'estate associato alla diminuita competenza termoregolatoria dovuta all'intensiva selezione genetica a cui esse sono sottoposte. Lo stress da caldo ha degli effetti diretti sul follicolo e il suo oocita sia immediati che protratti nel tempo, suggerendo che perturbazioni nel microambiente follicolare, alle quali gli oociti sono esposti per lunghi periodi del loro sviluppo, riducano la loro capacità di crescita. Tra le potenziali alterazioni ci sono la riduzione nella secrezione di gonadotropine, alterazioni nella crescita follicolare, diminuzione nella dimensione del follicolo dominante con attenuazione della dominanza e un disturbo nella steroidogenesi. Sempre secondo Roth, lo stress da caldo può compromettere la crescita sia dei piccoli follicoli antrali (che sarebbero sensibili al calore già a partire da 0,5 mm di diametro), sia dei follicoli di medie dimensioni, causando un calo di inibina e un aumento di FSH e quindi un'emergenza precoce della seconda ondata follicolare e del follicolo preovulatorio, e una prolungata durata della dominanza. E' necessario un periodo da due a tre cicli estrali per recuperare il danno da calore e per avere la ricomparsa di oociti competenti.

Lerner e collaboratori (1986), invece, avevano riscontrato un maggior numero di embrioni totali e trasferibili durante la primavera. Massey e Oden (1984) infine non trovarono alcuna correlazione tra la stagione e gli embrioni prodotti, riferendosi alle bovine allevate nel sud-ovest degli Stati Uniti. In realtà Gordon (1996) riporta una certa conflittualità nei risultati ottenuti dai vari autori in materia di "effetto stagionale", sottolineando anche che le ragioni di tale conflittualità potrebbero non essere sempre chiare a causa della complessità dei fattori nutrizionali e ambientali associati ad ogni particolare stagione.

Per quanto riguarda l'influenza dell'età della donatrice, le bovine che raggiungono i dieci anni d'età presentano un calo nella risposta superovulatoria (Stroud e Hasler 2006), e in generale, all'aumentare dell'età della donatrice diminuisce sia il numero di embrioni ottenuti e trasferibili, sia il tasso di fertilizzazione (Lerner et al. 1986, Malhi et al. 2007). Secondo Lerner, il numero di oociti/embrioni ottenuti dalla superovulazione, dovrebbe aumentare progressivamente nelle bovine giovani, per poi raggiungere un picco attorno a 5,6 anni d'età e successivamente diminuire. I motivi di questi risultati risiederebbero nel calo delle performance riproduttive (inteso come cambiamenti dell'ambiente intrauterino e intrafollicolare) legato all'aumento dell'età: ciò sarebbe dovuto alla diminuzione con l'età sia del numero di follicoli capaci di rispondere alle gonadotropine esogene sia del numero di follicoli in crescita a causa della riduzione di oociti disponibili (questo fenomeno è ancora più evidente nelle bovine a tre ondate per ciclo, nelle quali si ha un consumo ancora più precoce dell'ovaio dovuto alla deplezione più veloce degli oociti disponibili,

Adams 2008). Questa situazione porterebbe a un calo della produzione di inibina secreta dalle ovaie e a un aumento nelle concentrazioni di FSH endogeno: ciò farebbe sì che i follicoli in crescita delle bovine più vecchie si trovino ad uno stadio di sviluppo più avanzato rispetto a quelli delle bovine giovani. Al momento del trattamento con le gonadotropine esogene, questi follicoli più maturi sarebbero i primi a produrre grandi quantità di estrogeni, e perciò gli oociti all'interno di questi follicoli sarebbero esposti ad alte concentrazioni di estrogeni per periodi più lunghi prima dell'ovulazione rispetto a oociti all'interno di follicoli meno maturi. Questa situazione diminuirebbe il tasso di fertilizzazione e aumenterebbe anomalie di sviluppo (Lerner 1986, Malhi 2007). Anche Adams e collaboratori (2008) riscontrarono che le concentrazioni di FSH circolante sono molto più elevate nelle bovine vecchie rispetto alle giovani, ma nonostante questo, un minor numero di piccoli follicoli (4-5 mm) vengono reclutati in ogni ondata follicolare, inoltre il follicolo ovulatorio e il corpo luteo sono più piccoli e meno follicoli si sviluppano a seguito di un trattamento superovulatorio. Desaulniers e collaboratori (1995) analizzando le cause della scarsa risposta superovulatoria nelle bovine mature (limitato sviluppo dei follicoli di 4-5 mm, ritardata luteolisi e aumento di gonadotropine in seguito a superovulazione), conclusero che alcuni disordini riproduttivi vengono alla luce solo nelle bovine superovulate, mentre non sono evidenti in quelle non stimulate.

Per quanto riguarda invece le manze, sia Stroud e Hasler (2006) che Mollo e collaboratori (2007) dissero che esse tendono a produrre in media meno embrioni rispetto alle vacche: questi autori ne portarono a motivazione da un lato un limite fisiologico legato a uno sviluppo ancora incompleto dell'apparato genitale, dall'altro il management e l'alimentazione, che nelle manze è solitamente di qualità inferiore rispetto alle vacche. Secondo Mermillod e collaboratori (2008) la capacità di sviluppo degli oociti aumenta con l'aumentare dell'età, e nelle manze è ancora incompleta.

I fattori appena descritti sono imprescindibilmente legati al discorso dello sviluppo follicolare. Con il termine "capacità di sviluppo follicolare" (o qualità dell'oocita) si intende la sua abilità di maturare, di essere fecondato e di dare vita a una prole normale e fertile dopo una normale gestazione (Duranthon e Renard 2001). Lo stato energetico della bovina modula la secrezione di ormoni che giocano un ruolo chiave nella crescita follicolare, nell'ovulazione, nella formazione del corpo luteo e, appunto, nella suddetta capacità di sviluppo follicolare (Bisinotto et al. 2012). Studi recenti hanno dimostrato che una donatrice risente di situazioni metaboliche che si sono verificate almeno due mesi prima del trattamento di superovulazione, che avviene generalmente dai 90 ai 120 giorni

dopo il parto (Guarneri in Sali 2013) e la qualità dell'oocita dipende sia dallo stato fisiologico della donatrice sia da un controllo a livello genetico nella capacità di sviluppo follicolare (Mermillod et al. 2008). Ma vediamo più nel dettaglio cos'è la capacità di sviluppo follicolare. Al momento della formazione dell'antro, la qualità dell'oocita è già determinata da specifici geni da esso custoditi, e sarà espressa innanzitutto attraverso la sua abilità di guidare la crescita follicolare in un ambiente ormonale progressivamente più competitivo sino all'ovulazione, evitando l'atresia, e successivamente attraverso l'abilità di supportare l'iniziale sviluppo embrionale e di iniziare l'attività trascrizionale del genoma embrionale (Mermillod et al. 2008). Patologie e disturbi peri-partali sia clinici che subclinici sono la maggiore causa di depressione della fertilità, e il bilancio energetico negativo tipico del post-parto influenza direttamente la capacità di sviluppo del follicolo, causando un'alterazione del microambiente follicolare: da un lato, la temporanea insulino-resistenza periferica del post-parto provoca un calo della concentrazione intrafollicolare del glucosio, fondamentale per un'adeguata maturazione dell'oocita e per lo sviluppo della blastocisti, dall'altro l'aumento dei NEFA nel sangue, e di conseguenza nel liquido follicolare, provoca un calo della capacità di sviluppo dell'oocita e compromette l'iniziale sviluppo dell'embrione (Bisinotto et al. 2012). E' per questo che perturbazioni nella fisiologia dell'oocita durante lo sviluppo follicolare possono portare a un oocita con ridotta capacità di fecondazione e conseguente sviluppo (Roth 2008). Malhi e collaboratori (2007) confermarono che la capacità di sviluppo follicolare diminuisce anche con l'età della donatrice, manifestandosi come minor numero di embrioni prodotti e maggior numero di oociti non fertilizzati nelle bovine più vecchie sottoposte a superovulazione.

## **2. Scopo**

Lo scopo del presente lavoro è valutare le differenze, in termini di numero di embrioni trasferibili ottenuti, tra tre diversi protocolli di superovulazione, ossia:

- 1) Il metodo classico: trattamento superovulatorio con pFSH iniziato tra il giorno 8 e il giorno 12 del ciclo estrale
- 2) Un metodo farmacologico di superovulazione che utilizza un impianto intravaginale a rilascio di progesterone, insieme a somministrazione di GnRH e pFSH
- 3) Un metodo meccanico di superovulazione mediante aspirazione ecoguidata per via transvaginale seguita dalla somministrazione di pFSH





### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 *Animali e luoghi*

Il presente lavoro è stato condotto tra febbraio 2011 e febbraio 2013, utilizzando 185 bovine di razza frisona, di cui 47 manze e 138 vacche, provenienti da diverse aziende agricole di Lombardia, Emilia Romagna e Veneto e alimentate secondo una dieta bilanciata formulata in accordo con il Nutrient Requirements of Dairy Cattle (2001). Tali bovine sono state sottoposte a una preventiva valutazione ecografica dell'apparato riproduttore, per stabilire che fossero prive di patologie utero-ovariche e che fossero cicliche.

#### 3.2 *Protocolli di trattamento*

Le suddette 185 bovine sono state considerate idonee a subire uno dei tre trattamenti superovulatori qui di seguito descritti:

- 1) In 42 bovine è stato utilizzato un protocollo meccanico (Protocollo A) di soppressione del follicolo dominante, che consiste nell'aspirazione ecoguidata per via transvaginale dei follicoli superiori ai 5-8 mm di diametro (solitamente vengono aspirati i due o tre follicoli maggiori). 24-48 ore dopo l'aspirazione è stato seguito il seguente protocollo superovulatorio:  
nove iniezioni di gonadotropine a base di FSH-LH da estrazione ipofisaria suina (pFSH), in ragione di due al giorno ogni 12 ore, a dosi decrescenti; i prodotti commerciali utilizzati sono il Folltropin® (450 UI totali) per le manze e il Pluset® (750-900 UI) per le vacche. Alla settima iniezione di pFSH si somministra contemporaneamente una dose luteolitica di prostaglandina PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , ripetuta dopo 12 ore in corrispondenza dell'ottava iniezione di FSH.
- 2) A 32 bovine è stato applicato un protocollo farmacologico (Protocollo F) di soppressione del follicolo dominante: esso consiste nell'applicazione di un impianto vaginale a lento rilascio di progesterone (nello specifico è stato utilizzato il PRID® Delta a 1,55 g di P<sub>4</sub>) con somministrazione, al momento dell'applicazione dell'impianto, di GnRH (250  $\mu$ g di Gonadorelina), seguito dopo 48 ore dal protocollo superovulatorio a base di pFSH citato per il metodo meccanico. L'impianto viene rimosso contemporaneamente alla seconda somministrazione di PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (la sera del quarto giorno). Questo metodo ha come scopo quello di ottenere l'atresia del follicolo dominante.

- 3) A 111 bovine è stato applicato il protocollo classico (Protocollo N), ossia il trattamento superovulatorio a base di pFSH citato per il metodo meccanico viene iniziato tra il giorno 9 e il giorno 13 del ciclo estrale senza alcun trattamento preparatorio.

### *3.3 Raccolta degli embrioni*

La donatrice viene fecondata due volte: la prima dopo 12 ore dal rilievo dell'estro (che di norma si ha dopo 48 ore dalla PGF2 $\alpha$ ), la seconda ripetuta a 10-12 ore dalla prima. Dopo 7 giorni dalla fecondazione, tutte le bovine sono sottoposte a flushing (lavaggio uterino) per la raccolta degli embrioni. Questa operazione viene svolta con la donatrice contenuta in un travaglio e con anestesia epidurale. Si utilizzano dei cateteri di Rush a due vie, aria e liquido, in silicone; per gli animali adulti generalmente si usano cateteri da 18 o 20 G mentre per le manze si utilizzano cateteri da 16 G. Il flushing viene eseguito secondo il metodo a piccoli volumi: si utilizza un liquido di lavaggio apposito chiamato PBS (Phosphate Buffered Salt solution), il catetere viene posizionato cranialmente alla biforcazione uterina, poco dopo la grande curvatura uterina, e 35-40 ml di PBS vengono spinti in utero a pressione con siringhe. Ogni corno deve essere "lavato" almeno 6-7 volte, e il liquido recuperato viene successivamente filtrato: gli embrioni a 7 giorni hanno una dimensione di 110-120 micron, perciò vengono utilizzati filtri di 45-50 micron. Il filtrato poi viene messo in piastra Petri di 10-12 cm, quadrettata sul fondo per facilitare la ricerca.

### *3.4 Valutazione degli embrioni*

Gli embrioni sono stati identificati in piastra Petri tramite stereo microscopio e classificati secondo le categorie qualitative indicate dall'International Embryo Transfer Society (Tab. 3.4.1): gli embrioni di categoria I sono stati congelati, quelli di qualità II e III sono stati trasferiti a delle bovine riceventi.

Nella valutazione degli embrioni oltre che la qualità bisogna considerare anche l'età degli stessi. Quando il flushing viene eseguito a 7 giorni dalla fecondazione, gli embrioni si possono trovare allo stadio di morula, di blastocisti o di blastocisti espansa. Lo stadio di sviluppo non pregiudica l'attecchimento per gli embrioni freschi, mentre per il congelamento le blastocisti espanse non sono commercializzabili, quindi si possono congelare solo morule o blastocisti.

Tab. 3.4.1: classificazione qualitativa degli embrioni secondo la IETS

Categoria di qualità	Classe	Descrizione
Eccellente/Buono	I	Massa embrionale simmetrica e sferica con i singoli blastomeri (cellule) uniformi in dimensione, colore e densità. Questo embrione è corrispondente al suo atteso stadio di sviluppo. Le irregolarità dovrebbero essere minime, e almeno l'85% del materiale cellulare dovrebbe essere una massa embrionale intatta e vitale. Questo giudizio dovrebbe essere basato sulla percentuale di cellule embrionali costituite dal materiale estruso nello spazio perivitellino. La zona pellucida dovrebbe essere liscia e non avere superfici concave o piatte che potrebbe causare l'adesione dell'embrione a una piastra petri.
Discreto	II	Moderate irregolarità nella forma complessiva della massa embrionale o nella dimensione, colore e densità delle singole cellule. Almeno il 50% del materiale cellulare dovrebbe essere una massa embrionale intatta e vitale
Scadente	III	Gravi irregolarità nella forma della massa embrionale o nella dimensione, colore e densità delle singole cellule. Almeno il 25% del materiale cellulare dovrebbe essere una massa embrionale intatta e vitale
Morti/Degenerati	IV	Embrioni degenerati, oociti o embrioni a una cellula: non vitali

(adattato da Strigfellow e Seidel 1998)

### 3.5 Dati raccolti

Nel presente lavoro, per ogni flushing sono stati raccolti i seguenti dati:

- Embrioni immediatamente trasferiti a delle bovine riceventi
- Embrioni congelati
- Numero di embrioni degenerati
- Numero di oociti non fertilizzati

### 3.6 Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati, seguendo la procedura GLM del software SigmaStat 2.03, attraverso One Way Anova utilizzando come variabile indipendente il metodo di superovulazione (A; F; N). Inoltre, i dati riguardanti il metodo meccanico (A) e quello classico (N) sono stati analizzati attraverso una Two Way Anova considerando come

variabile indipendente la stagione di raccolta (Estate; Autunno; Inverno; Primavera) e i dati riguardanti tutti e tre i protocolli (A, F, N) sono stati analizzati attraverso una Two Way Anova considerando come variabile indipendente l'ordine di parto (0; 1; 2; 3; 4). La significatività delle differenti distribuzioni è stata considerata con un  $P < 0,05$ .

## 4. Risultati

### 4.1 Confronto tra i tre protocolli superovulatori

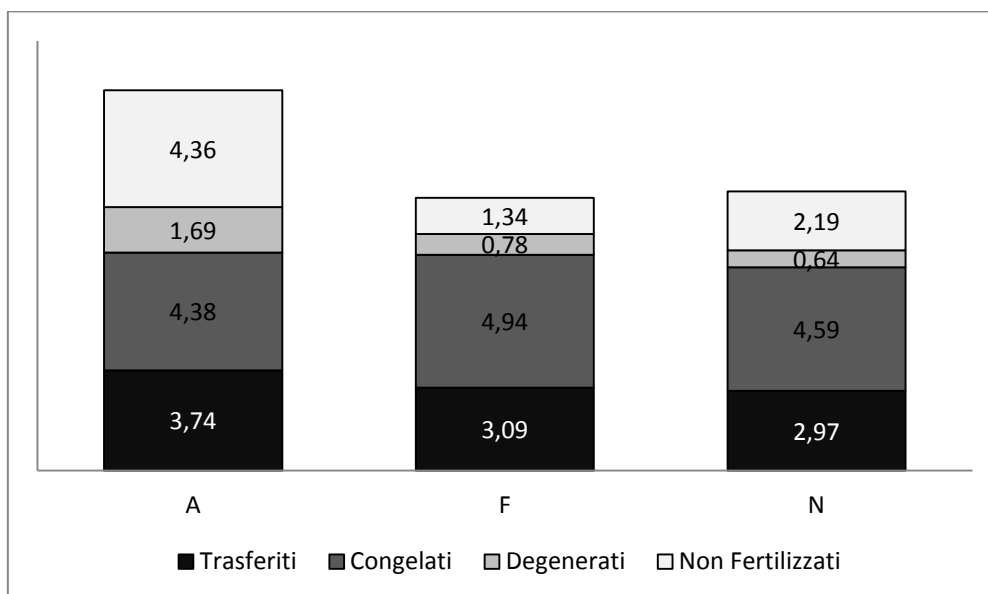
Al termine del presente lavoro non è stata individuata una differenza significativa tra i trattamenti né per quanto riguarda la media di embrioni trasferiti né per quanto riguarda la media di quelli congelati (Tab. 4.1.1). La media di embrioni totali ottenuti è significativamente più alta con il protocollo A rispetto a quello F e a quello N ( $14,17 \pm 8,7$  vs  $10,16 \pm 5,9$  e  $10,40 \pm 6,83$ ) ma il protocollo A presenta un numero medio di embrioni degenerati significativamente più alto rispetto a quello N ( $1,69 \pm 4,2$  vs  $0,64 \pm 1,17$ ) e una media di oociti non fertilizzati significativamente più alta sia rispetto al trattamento F che a quello N ( $4,36 \pm 5,22$  vs  $1,34 \pm 2,68$  e  $2,19 \pm 3,53$ ).

Tab.4.1.1 Confronto tra i tre protocolli meccanico (A), farmacologico (F) e classico (N) in termini di embrioni medi ottenuti

	A	F	N
<b>Embrioni totali medi</b>	$14,17 \pm 8,7^a$	$10,16 \pm 5,9^b$	$10,40 \pm 6,83^b$
<b>Embrioni trasferiti medi</b>	$3,74 \pm 3,39$	$3,09 \pm 2,36$	$2,97 \pm 2,31$
<b>Embrioni congelati medi</b>	$4,38 \pm 4,51$	$4,94 \pm 5,79$	$4,59 \pm 5,91$
<b>Embrioni degenerati medi</b>	$1,69 \pm 4,2^a$	$0,78 \pm 1,13^{ab}$	$0,64 \pm 1,17^b$
<b>Oociti non fertilizzati medi</b>	$4,36 \pm 5,22^a$	$1,34 \pm 2,68^b$	$2,19 \pm 3,53^b$

*Lettere diverse identificano una differenza significativa tra i protocolli*

Fig. 4.1.1: Confronto tra i tre protocolli meccanico (A), farmacologico (F) e classico (N) in termini di embrioni medi ottenuti



#### 4.2 Confronto tra i protocolli meccanico e classico rispetto alla stagione di raccolta

Il confronto dei protocolli in base alle stagioni di raccolta riguarda soltanto i protocolli A ed N in quanto i dati relativi al protocollo F nella stagione estiva non erano sufficienti per l'analisi statistica.

Anche in questo caso non è stata riscontrata una differenza significativa tra i due protocolli nel corso delle diverse stagioni dell'anno né relativamente agli embrioni trasferiti né a quelli congelati (Tab. 4.2.1). La media di embrioni totali raccolti è significativamente più alta col protocollo A in autunno ( $16,00 \pm 2,2$  vs  $9,58 \pm 1,14$ ) e inverno ( $17,54 \pm 2,03$  vs  $11,22 \pm 1,3$ ), ma in inverno anche la media di oociti non fertilizzati è significativamente maggiore col metodo meccanico ( $6,85 \pm 1,11$  vs  $2,41 \pm 0,71$ ). All'interno del singolo protocollo A, c'è una differenza significativa tra gli embrioni totali ottenuti in inverno e in estate ( $17,54 \pm 2,03$  vs  $9,00 \pm 2,44$ ).

Il trattamento F, pur escluso dall'analisi statistica, mostra per l'inverno, la primavera e l'autunno, risultati molto vicini a quelli ottenuti con il metodo classico (Fig. 4.2.2).

Fig. 4.2.1 Confronto tra i due protocolli meccanico (A) e classico (N) in base alle stagioni in termini di embrioni medi ottenuti

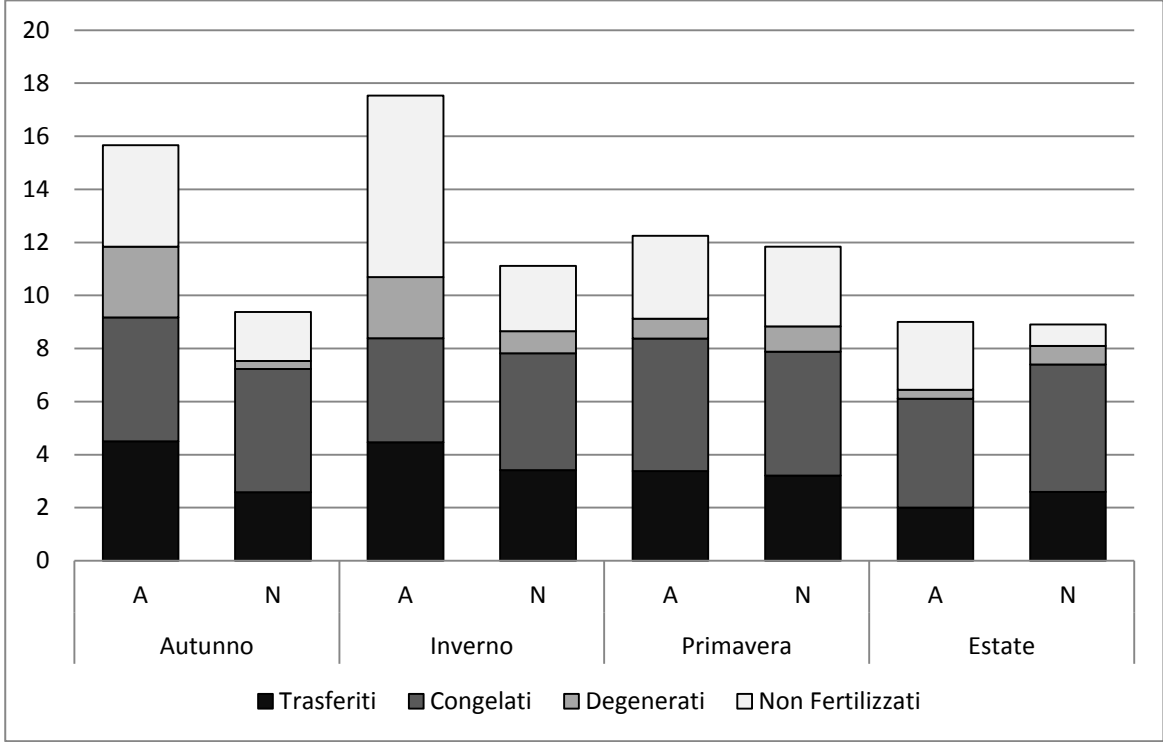
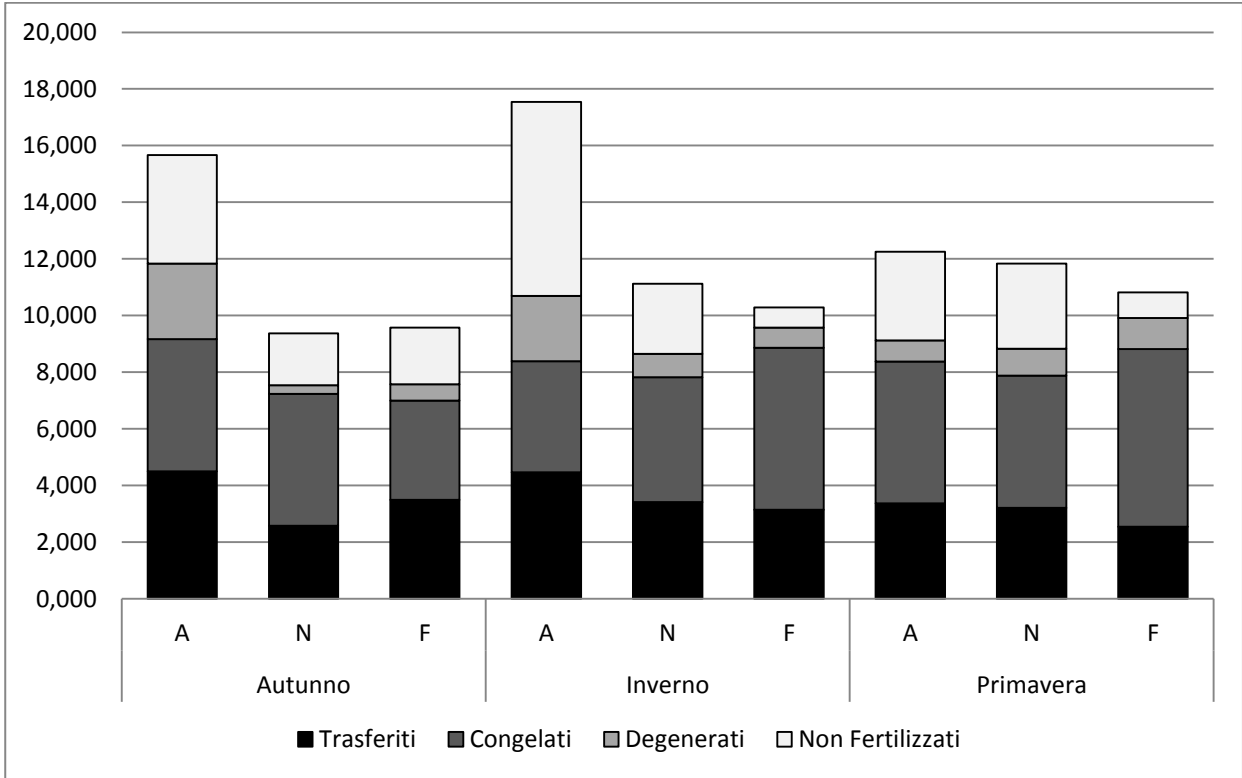


Fig. 4.2.2 Confronto tra i protocolli meccanico (A), farmacologico (F) e classico (N) in termini di embrioni medi ottenuti considerando le stagioni nelle quali si possedevano dati anche per F



Tab. 4.2.1 Confronto tra i due protocolli meccanico (A) e classico (N) in base alle stagioni in termini di embrioni medi ottenuti

	Totali		Trasferiti		Congelati		Degenerati		Non fertilizzati	
	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N
Autunno	16,00±2,2 <sup>a</sup>	9,58±1,14 <sup>b</sup>	4,82±0,8	2,63±0,41	5,09±1,73	4,88±0,9	2,91±0,73	0,32±0,38	3,18±1,21	1,76±0,63
Inverno	17,54±2,03 <sup>a*</sup>	11,22±1,3 <sup>b</sup>	4,46±0,73	3,44±0,47	3,92±1,6	4,5±1,02	2,31±0,67	0,88±0,43	6,85±1,11 <sup>a</sup>	2,41±0,71 <sup>b</sup>
Primavera	12,25±2,6	11,38±1,6	3,38±0,93	3,38±0,58	5,00±2,03	4,33±1,26	0,75±0,85	0,67±0,53	3,13±1,42	3,00±0,87
Estate	9,00±2,44 <sup>a</sup>	9,33±2,44	2,00±0,88	2,44±0,88	4,11±1,92	5,33±1,92	0,33±0,81	0,78±0,81	2,56±1,34	0,78±1,34

Lettere diverse identificano una differenza significativa all'interno della stagione tra i protocolli

Simboli diversi identificano una differenza significativa all'interno del protocollo tra le stagioni



### *4.3 Confronto dei tre protocolli rispetto all'ordine di parto*

Sono stati messi a confronto i risultati di tutte le bovine fino al quarto ordine di parto compreso, le bovine con ordini di parto superiori a 4 non sono state considerate a causa della ridotta numerosità delle rispettive classi (Tab. 4.3.1).

Nel complesso, indipendentemente dal trattamento usato, le bovine di terzo parto hanno fornito una media di embrioni trasferiti significativamente maggiore rispetto alle bovine di quarto parto ( $4,89 \pm 0,64$  vs  $2,35 \pm 0,63$ , Fig. 4.3.1). Sempre nelle bovine di terzo parto, con il metodo meccanico si ottiene un numero di embrioni trasferiti maggiore rispetto al metodo classico ( $7,50 \pm 1,27$  vs  $2,92 \pm 0,7$ ), ed anche una media di embrioni trasferiti significativamente maggiore rispetto alle bovine di quarto parto e alle manze che hanno subito lo stesso protocollo A (rispettivamente  $7,50 \pm 1,27$  vs  $1 \pm 1,13$  e  $2,22 \pm 0,85$ ).

Tra le primipare, la media di embrioni totali ottenuti col metodo meccanico è significativamente più alta rispetto a quella ottenuta con gli altri due metodi ( $22,57 \pm 2,68$  vs  $11,25 \pm 2,5$  e  $8,11 \pm 2,36$ ) ma lo stesso vale anche per gli embrioni degenerati ( $4,43 \pm 0,85$  vs  $0,63 \pm 0,79$  e  $0,67 \pm 0,75$ ). Il metodo meccanico ha anche un numero significativamente più alto di oociti non fertilizzati al quarto parto rispetto agli altri due trattamenti ( $8,80 \pm 1,67$  vs  $2,5 \pm 1,87$  e  $2,11 \pm 1,25$ ).

Per quanto riguarda i trattamenti presi singolarmente, nel trattamento meccanico si nota una media di embrioni totali significativamente maggiore nelle primipare rispetto alle manze ( $22,57 \pm 2,68$  vs  $9,11 \pm 2,36$ ) ma lo stesso vale per gli embrioni degenerati ( $4,43 \pm 0,85$  vs  $0,33 \pm 0,75$ ) che risultano significativamente maggiori anche rispetto alle bovine di quarto parto ( $4,43 \pm 0,85$  vs  $0,6 \pm 1$ ). Quest'ultime, infine, presentano un numero di oociti non fertilizzati significativamente maggiore sia rispetto alle manze ( $8,80 \pm 1,67$  vs  $2,33 \pm 1,25$ ) che alle bovine di secondo parto ( $8,80 \pm 1,67$  vs  $3,31 \pm 0,93$ ).

Fig.4.3.1: Confronto tra gli ordini di parto in termini di embrioni medi ottenuti indipendentemente dal protocollo

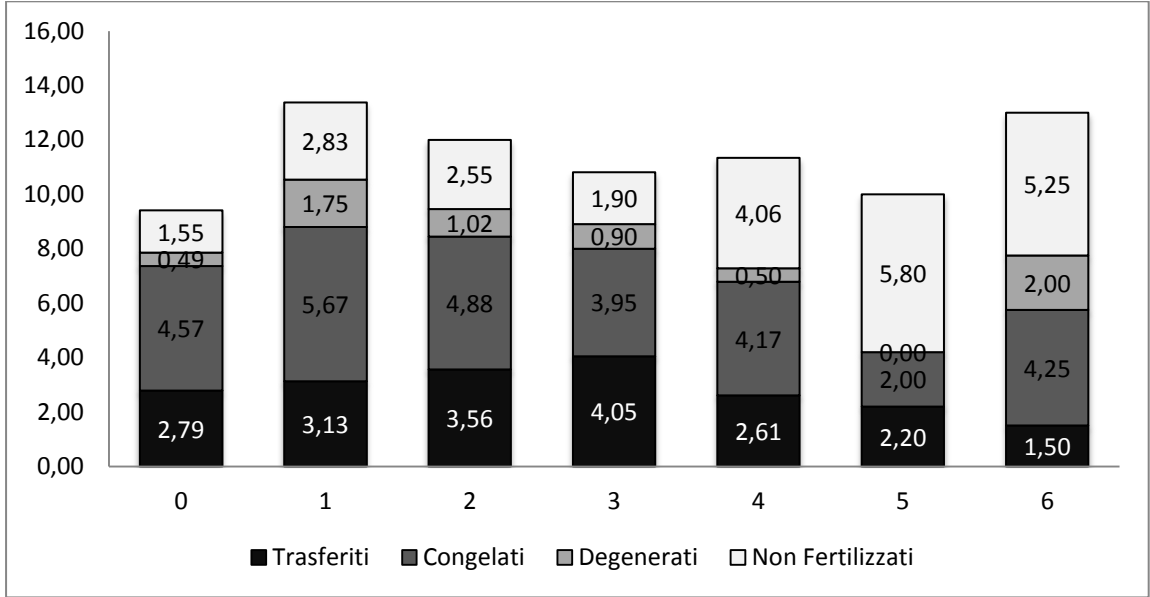
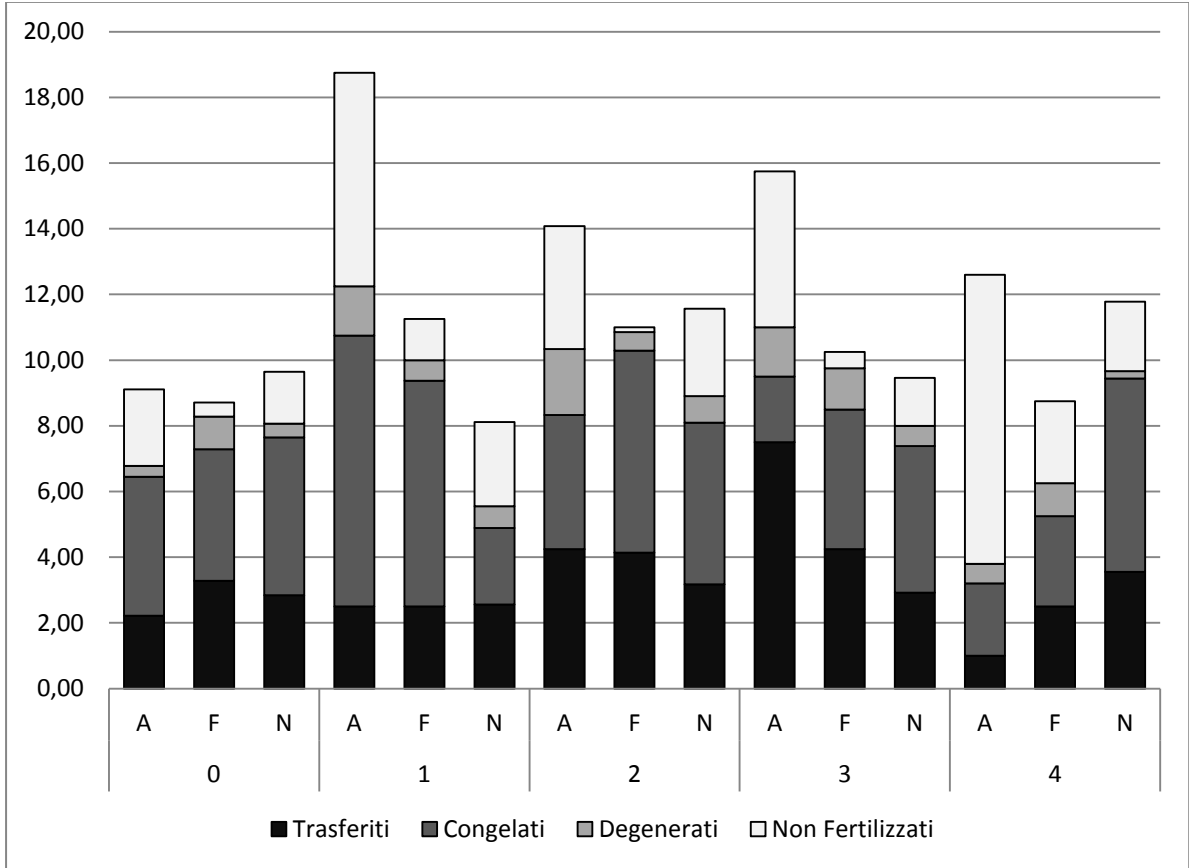


Fig.4.3.2: Confronto tra i tre protocolli meccanico (A), farmacologico (F) e classico (N) in base agli ordini di parto in termini di embrioni medi ottenuti



Tab.4.3.1: Confronto tra i tre protocolli meccanico (A), farmacologico (F) e classico (N) in base agli ordini di parto in termini di embrioni medi ottenuti

	Totali			Trasferti			Concelati			Degenerati			Non fertilizzati		
	A	F	N	A	F	N	A	F	N	A	F	N	A	F	N
0	9,11 ± 2,36 <sup>a</sup>	8,71 ± 2,67	9,65 ± 1,27	2,22 ± 0,85 <sup>a</sup>	3,29 ± 0,96	2,84 ± 0,46	4,22 ± 1,91	4 ± 2,17	4,81 ± 1,03	0,33 ± 0,75 <sup>a</sup>	1 ± 0,85	0,42 ± 0,4	2,33 ± 1,25 <sup>a</sup>	0,43 ± 1,41	1,58 ± 0,67
1	22,57 ± 2,68 <sup>a,s</sup>	11,25 ± 2,5 <sup>a</sup>	8,11 ± 2,36 <sup>a</sup>	4,57 ± 0,96	2,5 ± 0,9	2,66 ± 0,85	8,57 ± 2,17	6,88 ± 2,03	2,33 ± 1,91	4,43 ± 0,85 <sup>a,s</sup>	0,63 ± 0,79 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,75 <sup>a</sup>	5,00 ± 1,41	1,25 ± 1,32	2,56 ± 1,25
2	13,56 ± 1,77	11 ± 2,67	11,56 ± 1,1	4,31 ± 0,63	4,14 ± 0,96	3,17 ± 0,4	4,19 ± 1,43	6,14 ± 2,17	4,93 ± 0,9	1,75 ± 0,56	0,57 ± 0,85	0,8 ± 0,35	3,31 ± 0,93 <sup>a</sup>	0,14 ± 1,41	2,66 ± 0,58
3	15,75 ± 3,53	10,25 ± 3,53	9,46 ± 1,96	7,50 ± 1,27 <sup>a,s</sup>	4,25 ± 1,27 <sup>a,s</sup>	2,92 ± 0,7 <sup>a</sup>	2,00 ± 2,87	4,25 ± 2,87	4,46 ± 1,6	1,5 ± 1,12	1,25 ± 1,23	0,62 ± 0,62	4,75 ± 1,87	0,5 ± 1,87	1,46 ± 1,04
4	12,60 ± 3,17	8,75 ± 3,53	11,76 ± 2,36	1 ± 1,13 <sup>a</sup>	2,5 ± 1,27	3,56 ± 0,85	2,20 ± 2,57	2,75 ± 2,87	5,89 ± 1,91	0,6 ± 1 <sup>a</sup>	1 ± 1,12	0,22 ± 0,75	8,80 ± 1,67 <sup>a,s</sup>	2,5 ± 1,87 <sup>a</sup>	2,11 ± 1,25 <sup>a</sup>

Lettere diverse identificano una differenza significativa all'interno dell'ordine di parto tra i protocolli

Simboli diversi identificano una differenza significativa all'interno del protocollo tra gli ordini di parto



## 5. Discussione

### 5.1 Confronto tra i protocolli

Nel presente studio la media di embrioni ottenuti con l'aspirazione ecoguidata del follicolo dominante è significativamente maggiore rispetto al trattamento superovulatorio classico e a quello a base di PRID e GnRH, sebbene anche il numero di embrioni degenerati e di oociti non fertilizzati sia maggiore con questo trattamento, facendo sì che il numero di embrioni trasferibili ottenuti (ossia quelli trasferiti e quelli congelati) alla fine sia simile a quello ottenuto con gli altri due protocolli. Questo risultato è in linea con quanto già dimostrato da numerosi autori (Bó et al. 1995, De Ruigh et al. 1996, Bergfelt 1997, Baracaldo et al. 2000, Show e Good 2000, Kim et al. 2001, Bó et al. 2002), i quali presentarono dei lavori in cui l'aspirazione ecoguidata del follicolo dominante permetteva di ottenere più oociti/embrioni ma lo stesso numero di embrioni trasferibili rispetto al metodo classico. Bisogna anche sottolineare che molti degli autori che hanno sostenuto di aver riscontrato un maggior numero di embrioni trasferibili con il metodo di aspirazione, hanno ottenuto un numero medio di embrioni totali, trasferiti e/o congelati molto simile alle medie ottenute nel presente lavoro, ma probabilmente a causa di differenze nel campione o nella scelta del test, queste sono state valutate come "differenze significative" dai test statistici di volta in volta utilizzati.

Al di là di questo, il vantaggio offerto dal metodo meccanico e da quello a base di PRID e GnRH è quello di poter cominciare il protocollo superovulatorio in un qualunque momento del ciclo estrale senza dover attendere la finestra tra il giorno 8 e il giorno 13, e senza dipendere da un attento monitoraggio dell'estro, che molto spesso nelle nostre aziende non è eseguito in maniera molto precisa. Questi metodi permettono ad esempio di gestire le donatrici in base alle esigenze degli operatori, oppure di programmare, in una stessa area geografica, più donatrici che si trovano in momenti diversi del ciclo estrale, rendendo più pratico il lavoro per i veterinari sul campo.

## *5.2 Confronto tra i protocolli meccanico e classico rispetto alla stagione di raccolta*

Le stagioni che forniscono i dati più interessanti sono l'autunno e l'inverno: in entrambe, il protocollo meccanico permette di ottenere una media di embrioni totali significativamente maggiore rispetto al metodo classico, ma di questi un gran numero è costituito da embrioni degenerati e oociti non fertilizzati. I risultati ottenuti in primavera ed estate, invece, differiscono di poco, sebbene sempre a favore del metodo meccanico. Questi risultati sono in linea con quanto riportato da Agarwal (1993), Zeron et al. (2001) e Mollo et al. (2007) che riscontrarono un tasso ovulatorio e una produzione di embrioni maggiore in inverno, ma contrastano con quanto riportato da Lerner e collaboratori (1986) che avevano riscontrato un maggior numero di embrioni totali e trasferibili durante la primavera. Nella nostra opinione, non è sempre possibile confrontare lavori di autori di nazionalità tanto diverse, ma deve essere presa in considerazione la latitudine e la zona geografica in cui vivono le bovine: nel nostro paese è nota una notevole riduzione della fertilità nel corso dei mesi estivi, ma lo stesso effetto non si riscontra (o si riscontra in altri periodi dell'anno) in bovine situate ad esempio nell'Europa settentrionale o in altri continenti. Inoltre, anche tra le nostre aziende, esistono notevoli differenze in termini di management dello stress da caldo, con conseguenti ripercussioni in positivo o negativo sulla fertilità dei diversi gruppi di animali aziendali.

Riprendendo il discorso in merito allo sviluppo follicolare, dato che il follicolo è influenzato dagli eventi che hanno interessato la bovina nei 2-3 mesi precedenti al trattamento superovulatorio, si potrebbe spiegare il notevole aumento di oociti prodotti in inverno, con le condizioni atmosferiche ottimali che le bovine incontrano solitamente durante il nostro autunno: nel corso di questa stagione, esse recuperano dallo stress a cui sono state sottoposte durante gli afosi mesi estivi incontrando temperature più miti, e ponendo quindi i follicoli e i rispettivi oociti in delle condizioni decisamente favorevoli per un ottimale sviluppo.

### *5.3 Confronto tra i tre protocolli rispetto all'ordine di parto*

Per quanto riguarda il presente lavoro, mentre il protocollo N e quello F non producono differenze significative tra le bovine di diverso ordine di parto, è stato invece evidenziato un picco di embrioni prodotti con il protocollo A nelle primipare. Tra questi, però, è alto anche il numero di embrioni degenerati (molto più alto ad esempio rispetto alle bovine di quarto parto, cioè le più vecchie) e soprattutto quello di oociti non fertilizzati: il motivo potrebbe risiedere nel fatto che le primipare da un lato sono animali ancora giovani, non ancora del tutto sviluppati (e quindi con oociti non ancora del tutto competenti) ma dall'altro hanno già affrontato una gravidanza e un parto, e per questo risultano più stressati sia rispetto alle manze che rispetto alle secondipare o alle terzipare.

L'aspirazione del follicolo dominante dà buoni risultati nelle bovine fino al terzo parto, per avere poi un "crollo" in quelle più vecchie, nelle quali con questo metodo aumenta in maniera molto consistente il numero di oociti non fertilizzati, e nelle quali ha più successo il metodo classico rispetto agli altri due. Questo fenomeno è in linea con quanto sostenuto da Lerner e collaboratori, che individuarono un aumento nella produzione di oociti/embrioni fino a 5,6 anni d'età per poi avere un calo nelle performance riproduttive, e si spiega con il minor numero e la minor qualità degli oociti prodotti dalle bovine più vecchie, che hanno infatti un tasso di fertilizzazione molto più basso.

Per quanto riguarda le manze, i risultati sono simili tra i tre protocolli, ossia piuttosto scarsi sia per quanto riguarda gli embrioni totali che i trasferiti, mentre il numero degli embrioni degenerati e di quelli non fecondati è più basso rispetto alle vacche. Questo risultato è in linea con molti lavori precedenti: sia Stroud e Hasler (2006) che Mollo e collaboratori (2007) dissero che le manze tendono a produrre in media meno embrioni rispetto alle vacche. Il motivo è principalmente legato all'ancora incompleto sviluppo dell'apparato riproduttore in questi animali, e alla conseguente minor competenza dei loro oociti.





## 6. Conclusioni

I tre protocolli superovulatori indagati hanno fornito un numero simile di embrioni trasferiti e congelati, ma i due protocolli di soppressione del follicolo dominante, ossia quello meccanico e quello a base di PRID e GnRH, danno la praticità di iniziare il trattamento superovulatorio in un qualsiasi momento del ciclo estrale. Non sono state identificate differenze in termini di embrioni trasferibili tra le stagioni dell'anno, mentre è stato riscontrato un peggioramento delle performance all'avanzare dell'età della donatrice.

Il metodo basato sull'aspirazione del follicolo dominante è quello che produce un maggior numero di oociti, ma molti di questi non vengono fecondati: a nostro parere ciò non dipende dal protocollo in sé o dal metodo di fecondazione, ma piuttosto dalla qualità degli oociti prodotti e quindi dalla donatrice, in quanto questo fenomeno si concentra in specifiche categorie di animali. Il maggior numero di oociti non fertilizzati si riscontra infatti nelle primipare, ossia animali ancora in fase di sviluppo stressati dalla prima gravidanza, e nelle bovine di quarto parto, ossia nelle più vecchie. In questi animali, per i motivi appena citati, è alto il numero di oociti non correttamente sviluppati: in corso di superovulazione viene modificato l'ambiente ormonale attraverso somministrazione di pFSH esogeno, questo allevia la pressione selettiva sui follicoli e permette a un maggior numero di essi di raggiungere l'ovulazione, compresi quindi quei follicoli con oociti scadenti che in condizioni normali andrebbero incontro ad atresia (Mermillod et al. 2008).



## 7. Bibliografia

1. Adams G.P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P., 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69:1, 72-80
2. Agarwal S.K., Taneja V.K., Yadav M.C., Shankar U., 1993. Effect of season on superovulation response, recovery rate and quality of embryos in crossbred cattle. *Indian Journal of Animal Science* 63, 505-510
3. Baracaldo M.I., Martinez M.F., Adams G.P., Mapletoft R.J., 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 53:6, 1239-1250
4. Baruselli P.S., Ferreira R.M., Sales J.N., Gimenes L.U., Sá Filho M.F., Martins C.M., Rodrigues C.A., Bó G.A., 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76:9, 1583-93
5. Beal W.B., 1999. Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA, 66-77
6. Bellows R.A., Short R.E., 1972. Superovulation and multiple births in beef cattle. *Journal of Animal Science* 34, 67-79
7. Bergfelt D.R., Bó G.A., Mapletoft R.J., Adams G.P., 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Animal Reproduction Science* 49:1, 1-12
8. Bergfelt D. R., Brogliatti G. M., Adams G. P., 1998. Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. *Theriogenology* 50:1, 15-25
9. Bisinotto R.S., Greco L.F., Ribeiro E.S., Martinez N., Lima F.S., Staples C.R., Thatcher W.W., Santos J.E.P., 2012. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Animal reproduction* 9:3, 260-272
10. Bó G. A., Adams G. P., Pierson R. A., Mapletoft R. J., 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43:1, 31-4
11. Bó G. A., Baruselli P. S., Moreno D., Cutaia L., Caccia M., Tríbulo R., Tríbulo H., Mapletoft R. J., 2002. The control of follicular wave development

- for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57: 1, 53-72
12. Bó G.A., Baruselli P.S., Chesta P.M., Martins C.M., 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 65:1, 89-101
  13. Bó G.A., Guerrero D.C., Adams G.P., 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 69:1, 81-87
  14. Boni R., Danza Sproviero C., 1998. Follicolo dominante? No grazie. *Notiziario SIET* luglio 1998
  15. Casida L. E., Meyer R. K., McShan W. H., Wisnicky W., 1943. Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 4:76
  16. Curtis J.L., 1991. Cattle embryo transfer procedure. Academic Press Inc.
  17. De Ruigh L., Van de Streek G., Van Wagendonk de Leeuw A.M., 1996. The effect of removal of the dominant follicle prior to superovulation on embryo yield. *Theriogenology* 45:1, 363
  18. Desaulniers D.M., Lussier J.G., Goff A.K., Bousquet D., Guilbault L.A., 1995. Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulation in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. *Theriogenology* 44:4, 479-497
  19. Duranthon V., Renard J.P., 2001. The developmental competence of mammalian oocytes a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology* 55, 1277-1289
  20. El-Sherry T.M., Matsui M., Kida K., Miyamoto A., Megahed G.A., Shehata S.H., Miyake Y-I., 2010. Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. *Theriogenology* 73, 488–495
  21. Garcia A., Salaheddine M., 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50, 575-585
  22. Gordon I., 1996. Controlled reproduction in cattle and buffaloes. Cab International

23. Guilbault L.A., 1991. The influence of the presence of a dominant follicle on superovulatory response in Holstein heifers. Bulletin-Agriculture Canada, Research Branch, no. 14, 25-27
24. Hafs H.D., 1985. A Futuristic Look into Reproductive Management. Journal of Dairy Science 68:10, 2827-2832
25. Hasler J.F., 1992. Current Status and Potential of Embryo Transfer and Reproductive Technology in Dairy Cattle. Journal of Dairy Science 75:10, 2857-2879
26. Heidari F. , Sadrkhanlo R. , Rastegarnia A., Ahmadi A., 2009. Effect of Different Protocol of Ovarian Stimulation, with Gonadotrophin on Concentration of Ovarian Hormones. Journal of Animal and Veterinary Advances 8: 6, 1219-1221
27. Hill B.R., Kuehner L.F., 1996. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: A field study. Theriogenology 45:1, 324
28. Huhtinen M., Rainio V., Aalto J., Bredbacka P., Mäki-Tanila A., 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. Theriogenology 37:2, 457–463
29. Keller D.S., Teepker G., 1990. Effect of Variability in Response to Superovulation on Donor Cow Selection Differentials in Nucleus Breeding Schemes. Journal of Dairy Science 73:2, 549-554
30. Kim I.H., Son D.S., Yeon S.H., Choi S.H., Park S.B., Ryu I.S., Suh G.H., Lee D.W., Lee C.S., Lee H.J., Yoon J.T., 2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. Theriogenology 55, 937-945
31. Kim U.H., Suh G.H., Nam H.W., Kang H.G., Kim I.H., 2005. Follicular wave emergence, luteal function and synchrony of ovulation following GnRH or estradiol benzoate in a CIDR-treated, lactating Holstein cows. Theriogenology 63, 260-268
32. Kohram H., Vahedi V., Nasrollahi S., Farahavar A., 2011. Superovulation following follicular synchronization with GnRH at random stages of the oestrous cycle in heifers. Czech Journal of Animal Science 56, 7–14

33. Lerner S.P., Thayne W.V., Baker R.D., Henschen T., Meredith S., Inskeep E.K., Dailey A., Lewis P.E., Butcher R.L., 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *Journal of animal science* 63, 176-183
34. Lima W.M., Vieira A.D., Thaller Neto A., Mezzalira A., Matos R.C., Gregory R.M., 2007. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. *Animal Reproduction Science* 100:3-4, 364-370
35. Malhi P.S., Adams G.P., Mapletoft R.J., Singh J., 2007. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reproduction* 134, 233-239
36. Mapletoft R.J., Steward K.B., Adams G.P., 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 42: 6, 601-611
37. Mapletoft R.J., 2006. Bovine embryo transfer in IVIS reviews in veterinary medicine. Ed international veterinary information service, Ithaca NY
38. Massey J.M., Oden A.J., 1984. No seasonal effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Theriogenology* 21, 196-217
39. Mermillod P., Dalbiès-Tran R., Uzbekova S., Thélie A., Traverso J.M., Perreau C., Papillier P., Monget P., 2008. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle?. *Reproduction in domestic animals* 43, 393-400
40. Merton J.S., De Roos A.P.W., Mullaart E., De Ruigh L., Kaal L., Vos P.L.A.M., Dieleman S.J., 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59:2, 651-674
41. Mitchell B.R., Martinez M., Bentley D.M., Mapletoft R.J., 1998. A comparison of estradiol 17 $\beta$  and GnRH in synchronizing follicle wave emergence on superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology* 49, 380
42. Mollo A., Lora M., Faustini M., Romagnoli S., Cairoli F., 2007. Some factors affecting embryo transfer success in dairy cows. *Journal of animal and veterinary advances* 6:4, 496-499

43. Moore K., Thatcher W.W., 2006. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 89:4, 1254-1266
44. National Research Council, 7th edn. National Academy Press, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Washington, USA
45. Peters A.R., Ball P. J. H., 1995. Reproduction in cattle. Blackwell Science
46. Riviere J.E., Papich M.G., 2009. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell
47. Roth Z, 2008. Heat stress, the follicle and its enclosed oocyte: mechanism and potential strategies to improve fertility in dairy cows. *Reproduction in domestic animals* 43, 238-244
48. Ryan K. J., 1989, Medically Assisted Conception: An Agenda for Research: Report of a Study. Committee on the Basic Science Foundations of Medically Assisted Conception, Institute of Medicine (U.S.). Division of Health Sciences Policy, National Research Council (U.S.)
49. Sali G., Taveggia T., 1984. Embryo transfer e miglioramento genetico. Atti del XVI Congresso Nazionale, Modena 11-13 Maggio 1984
50. Sali G., 1996. Manuale di Teriogenologia Bovina, Essegivi – Edagricole
51. Sato T., Nakada K., Uchiyama Y., Kimura Y., Fujiwara N., Sato Y., Umeda M., Furukawa T., 2005. The effect of pretreatment with different doses of GnRH to synchronize follicular wave on superstimulation of follicular growth in dairy cattle. *Journal of Reproduction and Development* 51:5, 573-578
52. Sauvè R., 2012. Atti del 21° convegno annuale SIET, SETE Convention, Torre in Pietro (Roma)
53. Scanlon P.F., 1972. Ovarian Response of Cows Following Pregnant Mare Serum Gonadotrophin Treatment during Two Successive Estrous Cycles. *Journal of Dairy Science* 55: 4, 527-528
54. Shaw D.W., Good T.E., 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 53:8, 1521-1528

55. Small J.A., Colazo M.G., Kastelic J.P., Mapletoft R.J., 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed AI in beef cattle. *Theriogenology* 71, 698-706
56. Son D.S., Choe C.Y., Choi S.H., Cho S.R., Kim H.J., M.H.Han, Ryu I.S., Suh G.H., Kim U.H., Kim I.H., 2007. Effect of estradiol benzoate or GnRH treatment prior to superstimulation in CIDR-treated, Korean native cows (*Bos taurus*). *Animal Reproduction Science* 100, 14–21
57. Sreenan J.M., 1978. Control of reproduction in the cow: a seminar in the EEC programme of coordination of research on beef production held at Galway, September 27-30, 1977. The Hague/Boston/London: Martinus Nijhoff for the Commission of the European communities
58. Stroud B., Hasler J.F., 2006 . Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology* 65, 65–76
59. Willett E.L., Black W.G., Casida L.E., Stone W.H., Buckner P.J., 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113, 247.
60. Wiltbank M.C., Sartori R., Herlihy M.M., Vasconcelos J.L.M., Nascimento A.B., Souza A.H., Ayres H., Cunha A.P., Keskin A., Guenther J.N., Gumen A., 2011. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 76:9, 1568–1582
61. Xu Z.Z., Burton L.J., 1999. Estrus Synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone and prostaglandin F2 $\alpha$ . *Journal of dairy science* 83:3, 471-476
62. Zeron Y., Ocheretny A, Kedar O., Borochoy A., Sklan D., Arav A., 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121, 447-454



## Ringraziamenti

Il presente lavoro non sarebbe stato possibile senza il fondamentale aiuto del dottor Pierluigi Guarneri, al quale vanno i miei più sentiti e sinceri ringraziamenti.

Ringrazio con il cuore il dottor Paolo Comar e il dottor Piergiulio De Stefano, ai quali saranno sempre indissolubilmente legati i miei primi passi nel mondo della buiatria: grazie per aver creduto in me e per aver rafforzato, giorno dopo giorno, il mio amore per questo difficile mestiere.

Grazie a chi ha reso questi cinque anni e mezzo indimenticabili. Alla mia Salmiz, che mi ha insegnato la filosofia del dobermann danzante in tante notti di cazzate o studio semiserio, a Tega, a Fabriz, Paolo, Mattia, Giulia e Piero, per essere stati la mia famiglia legnarese, a Ivan e i nostri filosofici viaggi in macchina; grazie a chi c'era alle partite a calcio davanti al Sisa, agli Agriparty, a correre sugli argini, alle cene, alle grigliate, alle serate che finiscono all'alba e a tutti coloro che a Legnaro mi hanno fatto sentire come e più che a casa.

Grazie agli amici che nonostante il passare degli anni e alla distanza sono rimasti sempre con me, come e più di prima: Mariagiorgia, Cesare, Paolo, Luca, Elisa, Davide, Selenia e soprattutto Stefano, che neanche il Belgio ha tenuto lontano.

Grazie a Leonardo, per essere finalmente arrivato dopo averlo tanto aspettato.

Grazie ai miei nonni, perché questa laurea è in parte anche loro.

Infine, ultimi ma più importanti, grazie a mamma e papà, perché non hanno mai smesso di sostenermi anche quando ho deciso di cambiare la mia vita iscrivendomi a medicina veterinaria, e, soprattutto, non hanno mai smesso di essere orgogliosi di me.

*"La più grande fortuna era non solo di essere affascinato dagli animali, ma di sapere quello che c'era da sapere su di loro"*

*James Herriot*